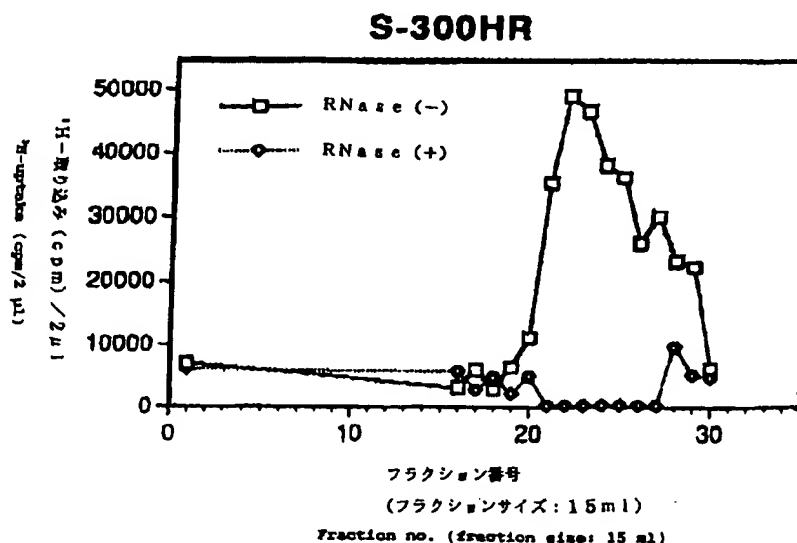




(51) 国際特許分類6 C12N 9/12	A1	(11) 国際公開番号 WO98/08938 (43) 国際公開日 1998年3月5日 (05.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02976 (22) 国際出願日 1997年8月27日 (27.08.97) (30) 優先権データ 特願平8/226869 1996年8月28日 (28.08.96) JP (71) 出願人; および (72) 発明者 吉田松年(YOSHIDA, Shonen)[JP/JP] 〒481 愛知県西春日井郡師勝町大字高田寺361 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫、外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: PROTEINS HAVING TELOMERASE ACTIVITY

(54) 発明の名称 テロメラーゼ活性を有するタンパク質



(57) Abstract

Proteins having a telomerase activity and being useful in screening telomerase inhibitors, developing diagnostic methods with the use of antibodies, etc. Conjugated proteins including proteins having a telomerase activity which have the following physicochemical properties: function and substrate specificity: catalyzing the elongation of the telomere DNA 3'-OH terminal of chromosomes of eukaryotes; molecular weight: ranging from about 40 to about 120 kD, in particular, about 110, 58 and/or 45kD in some cases, as determined by SDS-PAGE; inactivation: inactivated by treating with RNase; and characteristic: binding to mouse telomerase RNA.

(57) 要約

本発明の目的は、テロメラーゼ阻害剤のスクリーニング、抗体を用いる診断法の開発などに有用な、テロメラーゼ活性を有するタンパク質を提供することである。

本発明により、下記の理化学的性質を有するテロメラーゼ活性を有するタンパク質を含む複合タンパク質：

作用および基質特異性：真核生物の染色体のテロメアDNA 3' OH末端の伸長を触媒する；

分子量：SDS-PAGEで測定して、約40～約120 kD、特には約110 kD、約58 kDおよび／または約45 kD；

不活性化：RNase処理により不活性化される；

性質：マウステロメラーゼRNAと結合する；

が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

テロメラーゼ活性を有するタンパク質

技術分野

本発明は、テロメラーゼ活性を有するタンパク質に関する。さらに詳細には、
5 本発明は、ラット由来の培養細胞から精製されたテロメラーゼ活性を有するタン
パク質に関する。

背景技術

テロメラーゼは、テロメア末端（直鎖状染色体の末端部分）の伸長を触媒する
10 酵素であることが知られており、数多くの研究がなされている（Greider C. W. a
nd Blackburn E. H., (1987) Cell, 51, 887-898; Morine G. B. (1989) Cell, 59,
521-529）。テロメラーゼは、真核細胞の場合、テロメアDNA配列の5' T T
A G G G 3' に相補的な鋳型RNAを含む酵素で、鋳型RNAをもとにしてテロ
メアDNAの一本鎖を延長する一種の逆転写酵素として知られる酵素であり、真
15 核細胞の直鎖状DNAの3' 末端は、5' (T T A G G G) n 3' の一本鎖がと
びだした状態になっており、これがテロメラーゼ反応のプライマーになる。

テロメラーゼの活性は、造血幹細胞など一部の細胞を除き、正常細胞では検出
されない一方、癌組織の大部分で強いテロメラーゼ活性が検出できることから、
テロメラーゼは癌細胞の無限増殖の維持に関わっていると考えられる。

20 以上のようにテロメラーゼ活性は癌細胞に選択的に検出されることから、制癌
剤のターゲットとして大いに注目する価値がある。

テロメラーゼ酵素タンパク質については、全生物を通じて長い間精製されてい
なかったが、最近テトラヒメナのテロメラーゼで精製され、そのcDNAもクロ
ーニングされた（K. Collins et al., Cell, Vol. 81, p. 677-686 (1995)）。

25 しかし、ラットあるいはヒトなどのような哺乳動物から精製単離されたテロメ
ラーゼ活性を有するタンパク質については、現在の所未だ報告されていない。

発明の開示

本発明の目的の一つは、テロメラーゼ活性を有する新規なタンパク質、特に哺乳動物由来のテロメラーゼ活性を有するタンパク質を提供することである。

5 本発明の別の目的は、テロメラーゼ活性の測定方法の一つであるTRAP-S
PA法を使用して、テロメラーゼ活性を有するタンパク質を単離精製する方法を
確立することである。

本発明者は、上記課題を解決するために、原材料としてのラット由来肝細胞からテロメラーゼ活性を有するタンパク質を精製するための精製条件を鋭意検討した。その結果、本発明者は、硫酸アンモニウム沈殿と特定のカラムクロマトグラ
10 フィー精製処理の組み合わせとを行うことにより、比較的高いテロメラーゼ活性
を有する画分を得ることに成功し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、下記の理化学的性質を有するテロメラーゼ活性を有するタン
パク質を含む複合タンパク質：

作用および基質特異性：真核生物の染色体のテロメアDNA 3' OH末端の伸長
15 を触媒する；

分子量：SDS-PAGEで測定して、約40～約120 kD；

不活性化：RNase処理により不活性化される；

性質：マウステロメラーゼRNAと結合する；

を提供する。

20 上記のテロメラーゼ活性を有するタンパク質の分子量は、特に、SDS-P
AGEで測定して、約110 kD、約58 kDおよび／または約45 kDである。

さらに別の側面においては、本発明は、下記の理化学的性質を有することを特
徴とする、テロメラーゼ活性を有するタンパク質：

作用および基質特異性：真核生物の染色体のテロメアDNA 3' OH末端の伸長
25 を触媒する；

分子量：SDS-PAGEで測定して、約110 kD、約58 kDまたは約45
kD；

不活性化：RNase処理により不活性化される；

性質：マウステロメラーゼRNAと結合する；

を提供する。

本発明によるテロメラーゼ活性を有するタンパク質は、好ましくは、ラット肝細胞から精製することにより得ることができる。

5 また、本発明によるテロメラーゼ活性を有するタンパク質は、好ましくは、細胞抽出液を、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーに付して精製することにより得ることができる。

本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質の性質の一つとして、RNase処理により不活性化されることが挙げられる。

10 これは、テロメラーゼはリポタンパク質（タンパク質とRNAの複合体）であり、その活性の発現にはRNAサブユニット（テロメア配列を伸長する際の鋳型としての役割を担う）が必須であることに起因する。すなわち、テロメラーゼは、RNaseで処理されるとそのRNAサブユニットが分解されることによりテロメア配列伸長の際の鋳型を失い、不活性化されるのである。

15

図面の簡単な説明

図1は、Sephacryl S-300 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分画された各画分における³H-取り込み量を示すグラフである。

20 図2は、HyLoad SP カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより分画された各画分における³H-取り込み量を示すグラフである。

図3は、Sephacryl S-400カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分画された各画分における³H-取り込み量を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

25 以下に、本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質の調製方法の例を記載する。

テロメラーゼは、ヒト組織の場合、生殖巣および癌細胞で活性が見られることが知られており、また、生体ラット肝細胞において静止期および増殖期ともに高いテロメラーゼ活性が存在するとの報告もある。従って、本発明のテロメラーゼ

活性を有するタンパク質は、このようなテロメラーゼ活性を有する材料（培養細胞または組織など）から調製することが可能である。例えば、後に記載する実施例においては、本発明の一例を示すものとして、ラットのAH7974細胞から調製している。

- 5 上記のようなテロメラーゼ活性を有する材料から本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質の調製方法は、特定の方法に限定されるわけではないが、一般的には、無機塩類（例えば、硫酸アンモニウム、硫酸アルカリ金属、ハロゲン化アルカリ金属など）による塩析法、親水性有機溶媒（例えば、エタノールまたはイソプロピルアルコールなどのアルコール類、アセトンなどのケトン類）などによる溶媒沈殿法、イオン交換樹脂および各種カラムクロマトグラフィーによる吸脱着法、ゲル濾過法、限外濾過法、タンパク質沈殿剤（例えば、核酸、タンニンなど）の使用などを適宜組み合わせて利用することを含む。
- 10

さらにこのようにして得たテロメラーゼ活性を有するタンパク質は、等電点沈殿法、透析法、電気透析法、電気泳動法などによりさらに精製することができる。

- 15 例えば、ラット肝細胞抽出液を、40～60%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、その沈殿を緩衝液に溶解し、フィルター濾過後、ゲル濾過クロマトグラフィー（Sephacryl S-300カラムなど）により分画する。その活性画分を、陽イオン交換クロマトグラフィー（HyLoad SPカラムなど）により分画する。その活性画分を、60%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、その沈殿を緩衝液に溶解し、フィルター濾過した後、ゲル濾過クロマトグラフィー（Sephacryl S-400カラムなど）でさらに分画する。活性画分を分取し、8%SDS-PAGEで分析すると、各々 約110 kD、約58 kDおよび約45 kDに対応する3本のバンドが示される。
- 20

- さらに、本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質は、マウステロメラーゼRNAと結合することを特徴の一つとしている。この結合は、以下の実施例に記載するように、標識したマウステロメラーゼRNAを、テロメラーゼ活性を有するタンパク質を含むゲルに加え、一定時間放置した後、オートラジオグラフィーを行うことにより測定することができる。
- 25

テロメラーゼの精製単離の上で鍵となる重要な操作であるテロメラーゼ活性の

測定方法としては、これまでにいくつか報告されている。例えば、テトラヒメナにおけるテロメラーゼ活性の検出に関するものとして、単一のプライマー伸長アッセイ系によりテロメラーゼを検出するものが報告されている。しかしながら、この方法は、感度、検出に要する時間、定量性、そして大量のサンプル処理に問題
5 があった。これらの問題を解決するために、TRAP (telomeric repeat amplification protocol) と呼ばれるポリメラーゼ連鎖反応に基づく測定方法が開発され (Kim N.W. et al., (1994) Science, 206, 2011-2015; Piatyszek M.A. et al., (1995) Meth. Cell Sci; 17, 1-15)、感度および検出時間の問題が改善された。

10 しかしながら、このTRAP法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動やHPLCなどによる ^{32}P -標識反応産物や蛍光標識反応産物の分析を依然として必要としているため、測定できるサンプル数に制限があり、 ^{32}P の取り扱いの問題、操作に長時間を要すること、検出されたバンドの強度の定量の必要による結果の遅延などという問題を有していた。

15 上記のような問題を解決するために、より最近になって、迅速かつ高感度にテロメラーゼ活性を検出、定量するための方法として、TRAP-SPA法と呼ばれる方法が報告されている (特願平8-17830)。

本発明は、テロメラーゼ活性を有する新規なタンパク質を提供するものであり、その精製単離工程におけるテロメラーゼ活性の測定方法は特に限定されるわけ
20 ではなく、上記した何れの方法でも用いることができる。なお、以下の実施例では、迅速かつ高感度にテロメラーゼ活性を測定できるという点で最も好ましい方法であるTRAP-SPA法を使用している。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

25

実施例

実施例1：CHAPS抽出物の調製

ラット6匹分のAH7974細胞 (容積：40～50 mL) を氷冷したリン酸緩衝液に懸濁、遠心し、細胞を2度洗った。続いて、細胞を氷冷した洗浄緩衝液

(10 mMのHepes (pH 7.5); 1.5 mMのMgCl₂; 10 mMのKCl; 1 mMのDTT) で洗った後、遠心し、さらに沈殿を10 mLのCHAPS細胞抽出緩衝液(10 mMのTris-HCl (pH 7.5); 1 mMのMgCl₂; 1 mMのEGTA; 0.1 mMのPMSF; 5 mMの2-メルカプトエタノール; 0.5%のCHAPS; 10%のグリセロール) に懸濁した。氷上に30分間放置した後、15,000 rpmで30分間遠心して上清画分を得た。この画分はタンパク質濃度30 mg/ml × 30 mlを有していた。この細胞抽出液を以下の精製に用いた。

10 実施例2：硫酸アンモニウム沈殿

実施例1で得られた細胞抽出液に対して30分の1体積の1 MのTris-HCl (pH 8.3) を加えた後、40~60%飽和硫酸アンモニウム画分を分取した。続いて、この画分を20%グリセロールを含む緩衝液D(20 mMのTris-HCl (pH 7.5); 1 mMのEDTA; 1 mMのNa-bisulfate)
15 ; 0.01%のNP-40; 10%のグリセロール; 1 mMのベンズアミジン) 5~10 mLに溶解し、これをフィルター濾過(0.45 μm)した。得られた溶液のタンパク質濃度は42.78 mg/ml × 7 mlであった。

実施例3：Sephacryl S-300 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィー

20 実施例2で得られた硫酸アンモニウム画分を上記した緩衝液Dで平衡化した45 mm × 50 cmのSephacryl S-300 (Pharmacia) カラムで分画した。得られた画分を以下の手順でTRAP-SPA法で解析した。TRAP-SPA法は、テロメラーゼ活性に特異的な³H取り込みを検出するために、各画分についてRNaseで処理したものと(RNase(+))と未処理のもの(RNase(-))
25)の両方について実施した。なお、RNase処理は、各画分のサンプル20 μlに対し、1 μlのRNase(10 mg/ml)を加え、30℃で10分間インキュベートすることによって行った。

(TRAP-SPA法)

TSプライマー(配列番号1)及びCXプライマー(配列番号2)を、ABI

社のDNA合成機を用いて合成した。CX及びTSプライマーをビオチン化したものについては、オリゴヌクレオチドの5'末端にビオチンLCビオチン-ONTMホスホルアミダイト (Clontech) をカップリングさせることにより合成した。ABI OPCカラムを用いてプライマーを精製し（精製は製造業者の使用説明書に基づいて行った）、凍結乾燥し、DEPC（ジエチルピオロカーボネート）で処理した水中に再懸濁させた。

0.01~0.1 μ gのビオチン化CXプライマー（Biot-CX）をHot-Startチューブ（GIBCO-BRL）のワックス層下にトラップさせた。

次に、20 μ lの溶離液画分（RNase処理したもの又は未処理のもの）を、20mMのTris-HCl（pH 8.3）、1.5mMのMgCl₂、63mMのKCl、0.005%のTween 20、1mMのEGTA、各々50 μ MのdATP及びdCTP、2 μ MのdTTP、50 μ MのdGTP、2 μ Ciの[Me-³H] TTP（Amersham, 114 Ci/mmol）、0.1 μ g/ μ lのBSA、2UのTaqポリメラーゼ、並びに、0.1 μ g又は所定量のTSプライマーを含む50 μ lの最終反応混合物中のワックスバリア上で、室温で30分間インキュベートした。

次に、合成されたテロメアオリゴヌクレオチドを増幅するため、混合物を90℃で90秒加熱し、次いで94℃で30秒、50℃で30秒及び72℃で45秒を1サイクルとして、これを31サイクルでポリメラーゼ連鎖反応を行った。

反応産物（40 μ l）を96ウェルプレート（Wallac）に移し、50 μ lのストレプトアビジン被覆の微小粒子フルオロマイクロスフィア（0.56MのEDTA中、1:4の溶液）を加え、37℃で10分間インキュベートし、ビオチン化した³H標識反応産物をストレプトアビジンビーズに結合させた。

プレートは、MicroBetaシンチレーションカウンター（Wallac）上でカウントした。

各画分と³H-取り込み量との関係を図1に示す。

テロメラーゼ活性を含む画分（溶出体積は315~375 mL；図1中のフラクション番号21~25）を分取した。この画分のタンパク質濃度は1.3 mg/mL \times 75 mLであった。

実施例4：HyLoad SPカラムによる陽イオン交換クロマトグラフィー

実施例3で得たゲル濾過活性画分75mlを緩衝液Dで平衡化したHiLoad SP
カラム (Pharmacia; 16mm×10cm) にかけて、0.0～1.0MのKCl
でグラジエント溶出した。それぞれの画分を実施例3と同様にしてTRAP-SPA
5 PA法により解析した。各画分と³H-取り込み量との関係を図2に示す。

テロメラーゼ活性が認められる約0.1～0.3MのKClにより溶出される
画分 (図2中のフラクション番号43～47) 27.5mLを分取した。

この画分に含まれるタンパク質を硫酸アンモニウム沈殿 (60%飽和) に付し
た。続いて、沈殿を4mLの20%グリセロールを含む緩衝液Dに溶解した。こ
10 の時点でのタンパク質濃度は1.0mg/mlであった。次いで、この試料をフィ
ルター濾過 (0.45μ) した。

実施例5：Sephacryl S-400 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィー

実施例4で得たHiLoadカラム精製標品を緩衝液D+50mMのKClで平衡化
15 した15mm×75cmのSephacryl S-400 (Pharmacia) カラムでさらに分画し
た。それぞれの画分を実施例3と同様にしてTRAP-SPA法により解析した。
各画分と³H-取り込み量との関係を図3に示す。

テロメラーゼ活性を含む画分 (図3中のフラクション番号22) 3mlを分取
した。この画分のタンパク質濃度は、0.289mg/mlであった。

20

実施例6：SDS-PAGEによる分析

実施例5で得たテロメラーゼ活性を含む画分 (図3中のフラクション番号22)
を、8～10%のゲル濃度を用いてSDS-PAGEにより分析した。

その結果、約40～約120kDの間に複数のバンドが検出され、特には、約
25 110kD、約58kDおよび約45kDのバンドが強く検出された。

実施例7：テロメラーゼ活性を有するタンパク質のサブユニットへのテロメラー ゼRNAの結合

(1) マウステロメラーゼRNAのクローニング

Mouse Liver Total RNA (CLONTECH, CATALOG # 64042-1) をソースとし、RT-PCR法によりマウステロメラーゼRNA遺伝子を増幅し、pGEM-3Zf (-) ベクターのSma I サイトにサブクローニングした (pGEM 3Zf /mTR)。用いた5' 及び3' プライマーは、それぞれ、
5' - GGG GTA TTT AAG GTC GAG GGC GGC -3'
5' - TTG TGA GAA CCG AGT TCC GGG TGC -3'
である (配列番号3および4)。

(2) マウステロメラーゼRNAの調整

BamH1で切断したpGEM3Zf /mTR (T7 RNAポリメラーゼによりセンス鎖が合成されるように、テロメラーゼRNA遺伝子が挿入されているベクター) を鋳型にし、³²PラベルしたテロメラーゼRNAを、Riboprobe Combination System-SP6/T7 (Promega) を用い、使用説明書に従い調製した (合成されたテロメラーゼRNAには、5' 末端および3' 末端にベクター配列に由来する塩基GGG CGA AUU CGA GCU CGG UAC CCGと、AGG GGA UCとがそれぞれ付加される)。

(3) SDS-PAGEで分離したバンドへのテロメラーゼRNAの結合を、Collinsらの方法 (Cell, 81, 677-686) に基づいて解析した。

高いテロメラーゼ活性を含む画分 (図3中のフラクション番号22) を実施例6と同様に8% SDS-PAGEで分離した。タンパク質の巻き戻しを行う目的で、SDSゲルを50%メタノール水溶液で15分間、続いて10%エタノール水溶液で4時間振盪洗浄した。さらに、ゲルを50mMのTris-アセテート (pH 8.0)、10mMのMgCl₂、10%のグリセロールで平衡化した後、³²PラベルしたテロメラーゼRNAをYeast RNA (Sigma) とともに加えた。一晩放置した後、ゲルを洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

その結果、約40～約120kDの間に複数のバンドが検出され、特には、約110kD、約58kDおよび約45kDのバンドが強く検出された。

産業上の利用の可能性

本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質は新規なタンパク質である。

本発明のテロメラーゼ活性を有するタンパク質は、テロメラーゼ阻害剤のスクリーニング、抗体を用いる診断法の開発などのために有用である。

配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：

他の情報：TS Primer

配列：

AATCCGTCGA GCAGAGTT

配列番号：2

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

他の情報：CX Primer

配列：

CCCTTACCCT TACCCTTACC CTAA

配列番号：3

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGGCTATTTA AGGTCGAGGG CGGC

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

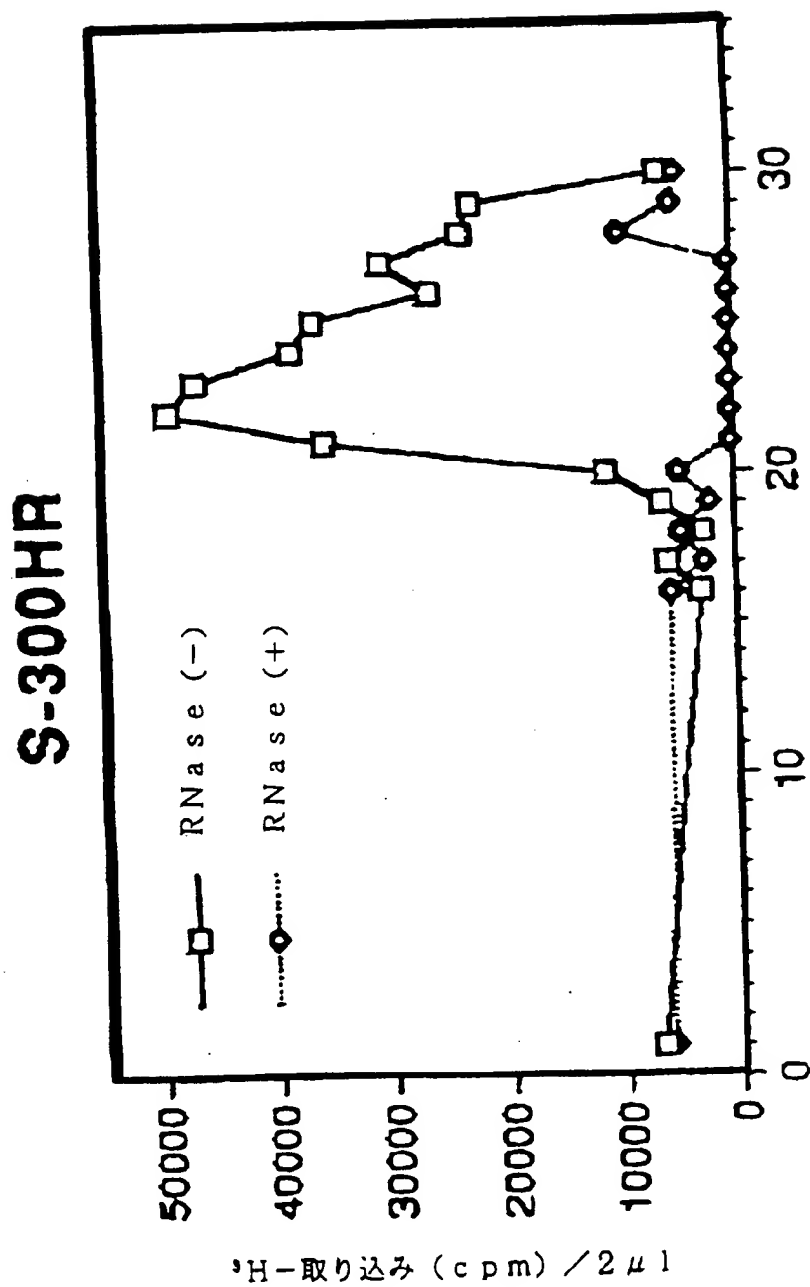
配列：

TTGTGAGAAC CGAGTCCGG GTGC

請求の範囲

1. 下記の理化学的性質を有するテロメラーゼ活性を有するタンパク質を含む複合タンパク質：
作用および基質特異性：真核生物の染色体のテロメアDNA 3' OH末端の伸長を触媒する；
5 分子量：SDS-PAGEで測定して、約40～約120 kD；
不活性化：RNase処理により不活性化される；
性質：マウステロメラーゼRNAと結合する；
2. テロメラーゼ活性を有するタンパク質の分子量がSDS-PAGEで測定して、約110 kD、約58 kDおよび／または約45 kDであることを特徴とする、請求の範囲第1項記載の複合タンパク質。
10
3. 下記の理化学的性質を有することを特徴とする、テロメラーゼ活性を有するタンパク質：
作用および基質特異性：真核生物の染色体のテロメアDNA 3' OH末端の伸長を触媒する；
15 分子量：SDS-PAGEで測定して、約110 kD、約58 kDまたは約45 kD；
不活性化：RNase処理により不活性化される；
性質：マウステロメラーゼRNAと結合する；
4. ラット肝細胞由来であることを特徴とする、請求項1から3の何れかに記載のタンパク質。
20
5. 細胞抽出液を、硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、次いでゲル濾過クロマトグラフィーに付して精製することにより得ることができることを特徴とする、請求項1から4の何れかに記載のタンパク質。
25

図 1



フラクション番号

(フラクションサイズ: 15 ml)

図 2

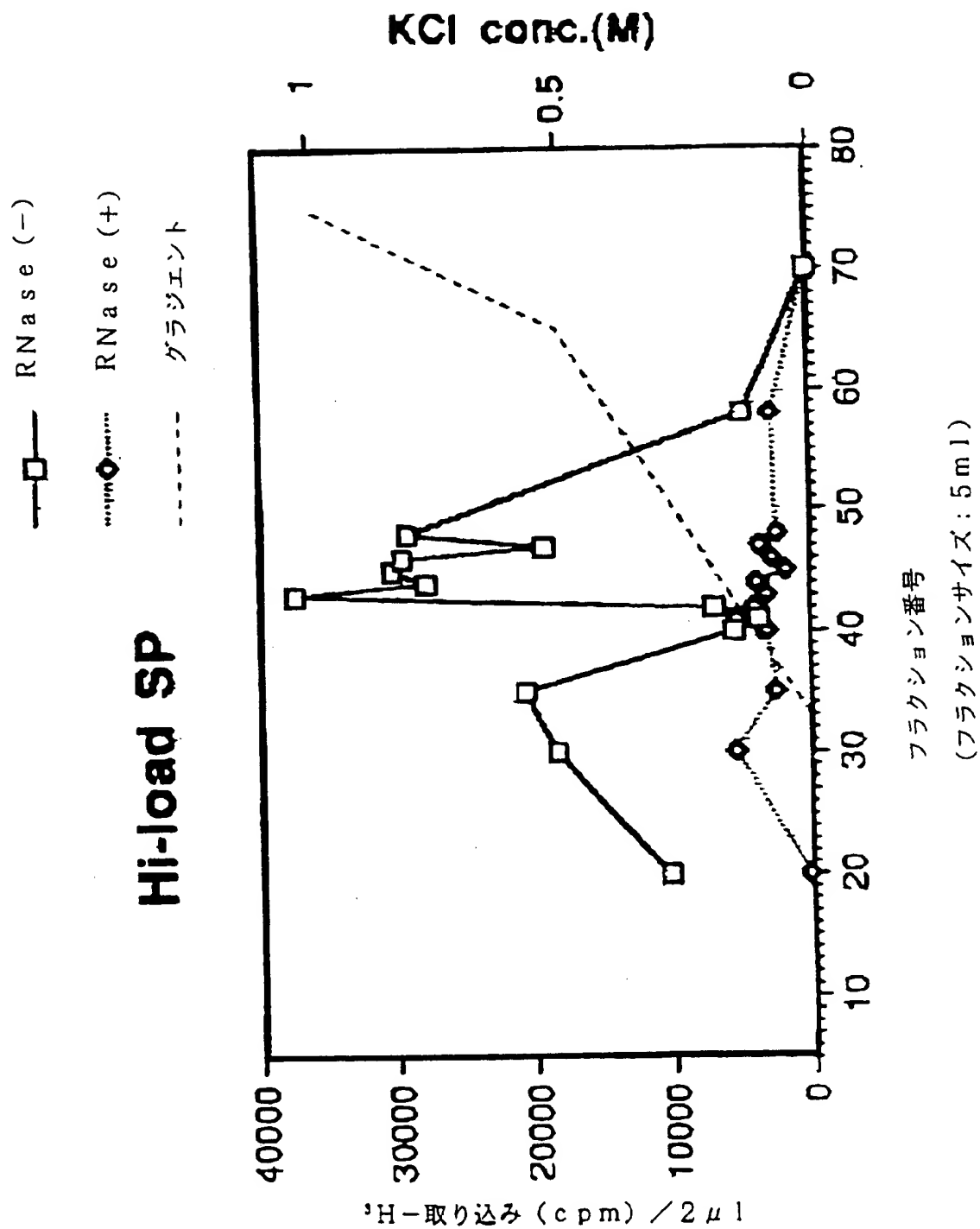
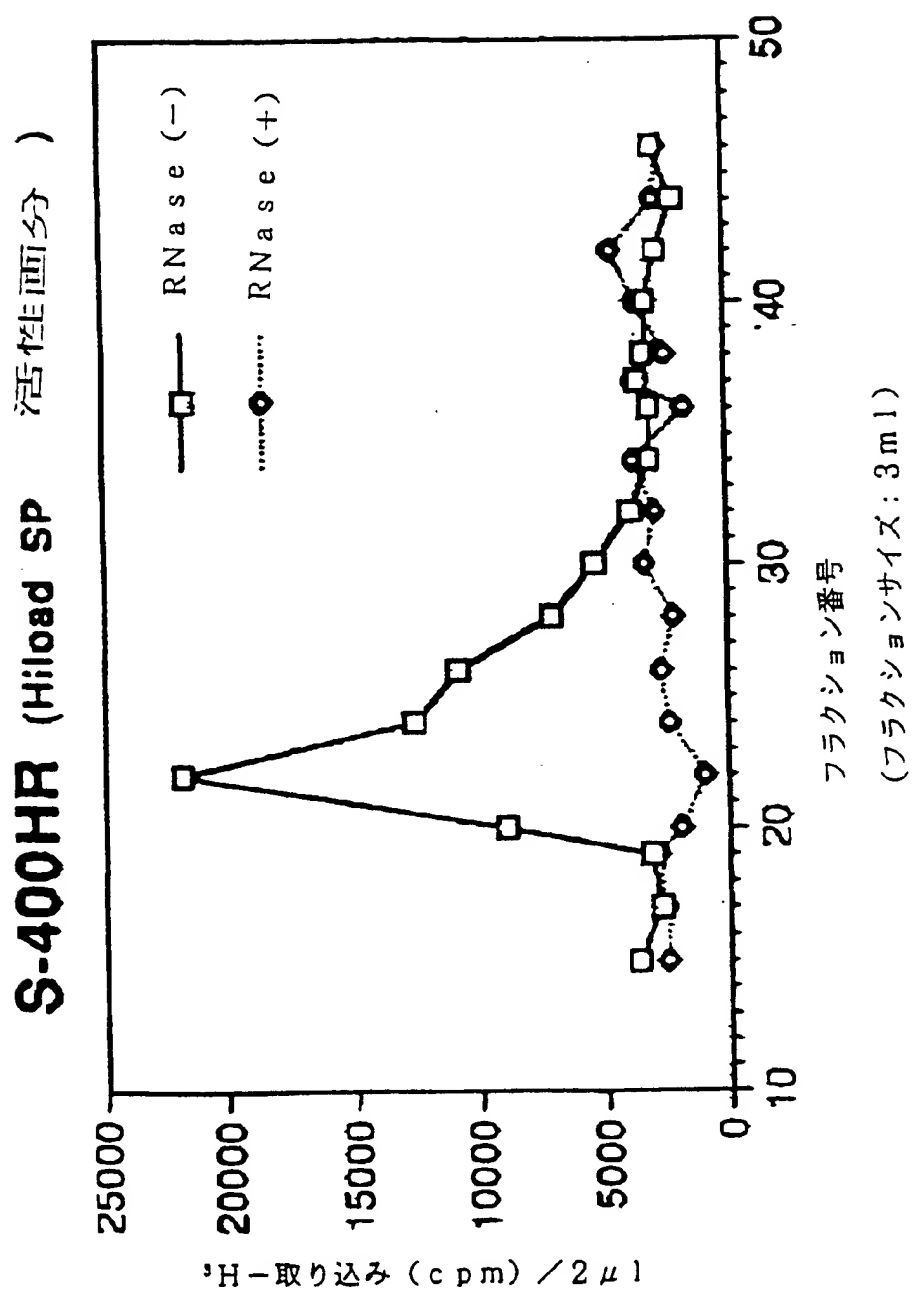


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Medline, Biosis Previews

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Molecular Carcinogenesis, Vol. 16, (May 1996), Yoshimi N. et al. "Telomerase Activity of Normal Tissues and Neoplasms in Rat Colon Carcinogenesis Induced by Methylazoxymethanol Acetate and Its Difference From That of Human Colonic Tissues" p. 1-5	1 - 5
A	Cell, Vol. 81, (1995), Collins K. et al. "Purification of Tetrahymena Telomerase and Cloning of Genes Encoding the Two Protein Components of the Enzyme" p. 677-686	1 - 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 30, 1997 (30. 09. 97)

Date of mailing of the international search report

October 7, 1997 (07. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N9/12		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N9/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Medline, Biosis Previews		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Molecular Carcinogenesis, 第16巻, (5月, 1996), Yoshimi N. et al「Telomerase Activity of Normal Tissues and Neoplasms in Rat Colon Carcinogenesis Induced by Methylazoxymethanol Acetate and Its Difference From That of Human Colonic Tissues」p. 1-5	1-5
A	Cell, 第81巻, (1995), Collins K. et al「Purification of Tetrahymena Telomerase and Cloning of Genes Encoding the Two Protein Components of the Enzyme」p. 677-686	1-5
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
30.09.97	07.10.97	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 平 田 和 男 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 7823